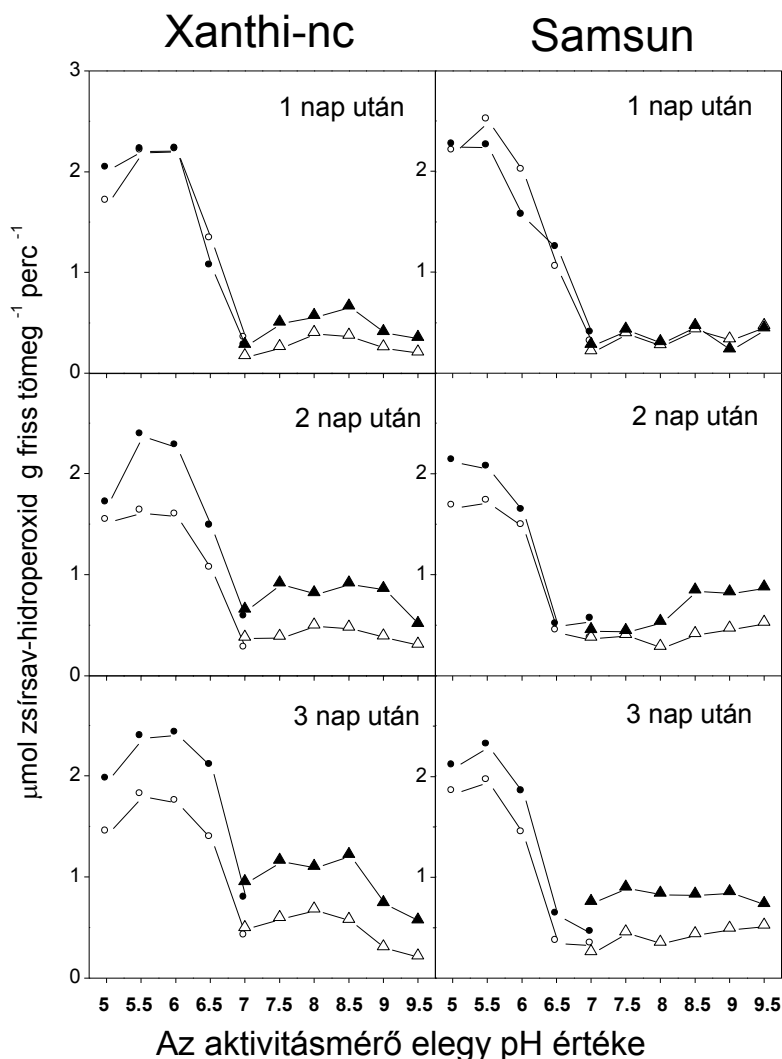


A lipoxigenáz izoenzimek és az oxilipinek szerepének vizsgálata bab és dohánynövények betegségellenállóságában

Pályázatunk célja a lipoxigenáz (LOX, E. C. 1.13.11.12) enzimek, valamint az általuk termelt zsírsav-hidroperoxidoknak és az ezekből képződő oxilipineknek a vizsgálata volt fertőzött növényekben. A LOX-ok a növényi szövetekben található többszörösen telítetlen zsírsavak (döntően a linolsav és linolénsav) peroxidációját katalizálják. A keletkező zsírsav-hidroperoxidok változatos enzimatis reakciókban továbbalakulhatnak különböző, sok esetben biológiailag aktív vegyületekké (ún. oxilipinekké). Az oxilipinek egy nagy létszámú, de igen különböző szerkezetű vegyületekből álló csoportot képeznek. Az oxilipinek fontos szerepet játszanak a fertőzött növények védekezési reakcióiban, egyrészt mint szignálvegyületek, másrészt direkt antimikrobiális hatásuk miatt. A leginkább ismert oxilipin reakciót a jázmonsav képződéséhez vezető reakciósor, amelynek első lépését az allénoxid-szintetáz enzim katalizálja. Egy további fontos reakciót a hidroperoxid-liáz (HPL) enzim által katalizált reakció. Ez az enzim a zsírsav-hidroperoxidok hasításával olyan aldehideket termel, amelyek fontos szerepet játszanak a fertőzött növényekben, egyrészt hívívó molekulákként, másrészt antimikrobiális hatásuknál fogva. A divinil-éter szintetáz (DES) enzim a zsírsav-hidroperoxidokat antimikrobiális hatású divinil-éterekké alakítja át. A zsírsav-hidroperoxidok méregtelenítésében fontos szerepet játszanak a növényi szövetekben található glutathion S-transzferáz (GST) izoenzimek.

1. Lipoxigenáz aktivitás indukciója TMV fertőzött dohány levelekben

A vizsgálataink kezdeti fázisában összehasonlítottuk az inkompatibilis és kompatibilis dohány-vírus kórokozó kölcsönhatásokban a LOX enzimaktivitás indukcióját. Xanthi-nc és Samsun dohányfajtákat fertőztünk dohánymozaik vírussal (TMV), a levelekből készített sejtmentes kivonatokban spektrofotometriás módszerrel mértük az enzimaktivitásokat. A Xanthi-nc növények levelein a fertőzést követően 2 nappal jelentek a tipikus betegségi tünetek (lokális nekrotikus léziók). A tünetek megjelenésével párhuzamosan nagymértékben megnövekedett a levélkivonatok teljes LOX aktivitása. A fertőzetlen kontroll Xanthi-nc levélkivonatokban a teljes LOX aktivitás maximuma pH 5,5 értéknél volt mérhető, de egy kisebb csúcs is megfigyelhető volt a pH 8,0 – 8,5 tartományban (1. ábra). A TMV-fertőzés



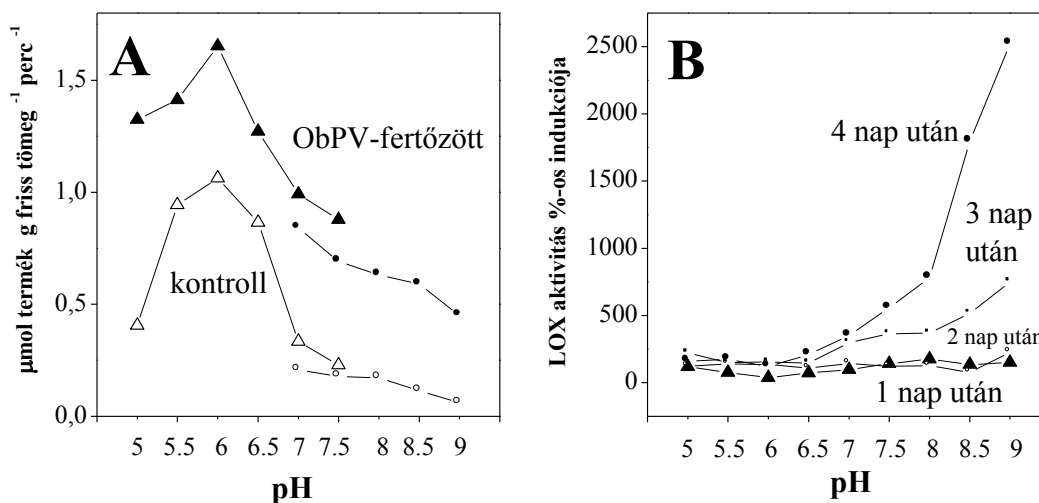
1. ábra. A lipoxigenáz aktivitás indukciója TMV fertőzés következtében Xanthi-nc és Samsun dohányfajták leveleiben, különböző pH értékű mérőelegyekben meghatározva. A savas tartományban citrát-foszfát (○,●) míg a lúgos tartományban borát puffereket használtunk (□,▲). A kitöltött jelzések (●,▲) mutatják a fertőzött leveleket, míg az üres jelölések (○, □) a kontroll leveleket. Három mérés reprezentatív eredményei szerepelnek az ábrán.

következtében a LOX aktivitás nagy mértékben emelkedett pH 5,5-nél, de a bázisos pH tartományban még jelentősebben indukálódott az aktivitás, a maximális növekedés pH 8,5-nél volt megfigyelhető. A bázisos pH tartományban már a fertőzést követő első napon észrevehetően megnőtt a LOX aktivitás. Három nappal a TMV fertőzés után a Xanthi-nc levélkivonatok LOX aktivitása pH 5,5-nél 1,3-szor, míg pH 8,5-nél 2,1-szer volt magasabb mint a kontroll levelekben. A TMV fertőzéssel szemben fogékony Samsun levelekben is

megfigyelhető volt a LOX aktivitás indukciója pH 5,5 értéknél, de lényegesen kisebb mértékben mint a Xanthi-nc növényekben. A bázikus pH tartományban is később indult meg és kis mértékű volt az enzimaktivitás indukciója (1. ábra). A pH függési görbéken megfigyelt kettős maximum valószínűleg arra utal, hogy a különböző, eltérő pH optimummal rendelkező LOX izoenzimek együtt indukálódnak a TMV fertőzés hatására. A különböző növényi LOX enzimek a szubsztrátként használt zsírsavláncoknak vagy a 9., vagy a 13. szénatomját képesek oxidálni molekuláris oxigén felhasználásával. Több vizsgálat szerint a 9-specificitással rendelkező enzimek pH optima 6 körül, míg a 13-specificitásúaké 8-9 körül mérhető, bár vannak ellentmondó megfigyelések is. A dohány genomjában lévő LOX gének száma nem ismert, részletesen mindössze egy gén szerepét vizsgálták eddig fertőzött növényekben (*NtLOX1*, GenBank azonosító: **X84040**).

2. Lipoxigenáz aktivitás indukciója vírusfertőzött paprika levelekben

Összehasonlításként a dohány mellett kísérleteket végeztünk paprikával is, amely közeli rokona a dohánynak, mindkét növény a *Solanacea* családba tartozik. A magokat Dr. Zatykó Lajos (Zöldségtermesztési Kutatóintézet, Budatétény) bocsátotta rendelkezésünkre. Paprika növények leveleiben megvizsgáltuk a LOX aktivitások változásait vírusfertőzéseket követően és összehasonlítottunk egy inkompatibilis és egy kompatibilis paprika-vírus kölcsönhatást. A kísérletekhez az L³ rezisztenciagént tartalmazó TL 1791 paprikafajtát használtuk. A kifejlett paprikanövények leveleit két különböző tobamovirussal fertőztük: az Óbuda paradicsom vírus (ObPV) nekrotikus léziókat okozott (hiperszenzitív reakció, inkompatibilis kapcsolat), míg a paprika enyhe tarkulás vírus (PMMoV) csak nagyon gyenge klorotikus tüneteket okozott (kompatibilis kapcsolat). Az ObPV fertőzés igen jelentősen fokozta a paprika levélkivonatok LOX aktivitását (2A. ábra). A fertőzött és kontroll levelek LOX aktivitásait különböző pH értékeknél meghatározva kitűnt, hogy a fertőzés okozta aktivitás-változás legjobban pH 9,0 értéknél követhető (2B. ábra). Ezért ezen a pH értéken követtük a LOX aktivitás indukciójának időbeni lefutását az ObPV és PMMoV-sal fertőzött levelekben. Az ObPV-sal fertőzött levelekben az aktivitás jelentős növekedése 3 nappal a fertőzés után jelentkezett, ami egybeesett a nekrotikus léziók megjelenésével. Az aktivitás folyamatosan emelkedett és 5 nappal az ObPV fertőzés után elérte a kontroll érték 51-szeresét. Az ObPV-sal szemben, a PMMoV fertőzés csak nagyon kis mértékben változtatta meg a levélkivonatok LOX aktivitását 3 és 4 nappal a fertőzés után, de ez a növekedés szignifikáns volt. Hasonló eredményeket értünk el az L⁴ rezisztenciagént tartalmazó 105/18-2 jelű paprikafajtával is



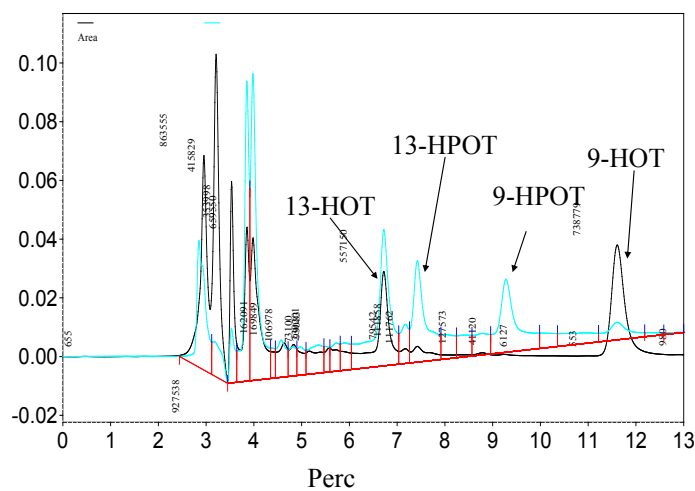
2. ábra. A lipoxigenáz enzimaktivitás indukciója Óbuda paprika vírussal (ObPV) fertőzött és kontroll TL 1791 paprika fajta leveleiben. A: aktivitások három nappal a fertőzést követően, B: az indukció kontrollhoz viszonyított százalékos mértéke a pH és a fertőzés után eltelt idő függvényében. A használt pufferek egyeznek az 1. ábránál bemutatottakkal. Három mérés reprezentatív eredményei szerepelnek az ábrán.

vírusfertőzések után. Inkompatibilis gazda-vírus kapcsolatok esetében a LOX aktivitás erősen megnövekedett a lokális nekrotikus léziók megjelenésével egyidőben. Kompatibilis kapcsolat esetén a LOX aktivitás megemelkedése nem volt számottevő. A vírus rezisztenciagént nem tartalmazó Javított Cecei paprikafajtát fertőzve ObPV-sal vagy PMMoV-sal - mindkét esetben kompatibilis vírus/növény kapcsolat van - nem volt lényeges változás az LOX aktivitásban.

Kiegészítő kísérletekben megmértük a LOX aktivitásokat 1 mM NaCN jelenlétében is. Ismert, hogy a cianid ionok gátolnak olyan hem-tartalmú aspecifikus peroxidáz enzimeket, amelyek a lipoxigenázokhoz hasonlóan szintén képesek a telítetlen zsírsavak oxidációjára, így befolyásolhatják a LOX méréseket. Az 1 mM cianid jelenléte csak kis mértékben mintegy 3-8 %-al csökkentette a mért aktivitást pH 9,0 értéknél, ami mutatta, hogy a peroxidázok jelenléte a paprikalevelek sejtmentes kivonatában nem befolyásolja jelentősen a mért LOX aktivitás értékeit. Az inkompatibilis kapcsolatban nért igen jelentős LOX enzimaktivitás emelkedés azt mutatta, hogy a lipoxigenáz-reakcióút aktiválódott, aminek eredményeképpen megnövekedhet egyes oxilipinek mennyisége is az ObPV-vel fertőzött paprika levelekben.

3. A lipoxigenáz enzimek által termelt zsírsav-hidroperidok elemzése HPLC-vel

HPLC módszerrel megvizsgáltuk a paprika levelek LOX izoenzimei által termelt zsírsav-hidroperoxidok helyzeti izoméria viszonyait (3. ábra). A fertőzött és kontroll levelekből készített sejtmentes kivonatokat pH 6 és 9 értékeknél linolénsav jelenlétében inkubáltuk, majd a keletkezett termékeket analizáltuk. A levélkivonatokban mind a 9-hidroperoxi-linolénsav (9-HPOT), mind a 13-hidroperoxi-linolénsav (13-HPOT) származékait ki tudtuk mutatni. Általában a 9-HPOT mennyisége magasabb volt, mint a 13-HPOT-é. A fertőzött levelekből készített kivonatokban több 9-HPOT termelődött a kontrollhoz képest, ami különösen pH 9,0-nél volt megfigyelhető.

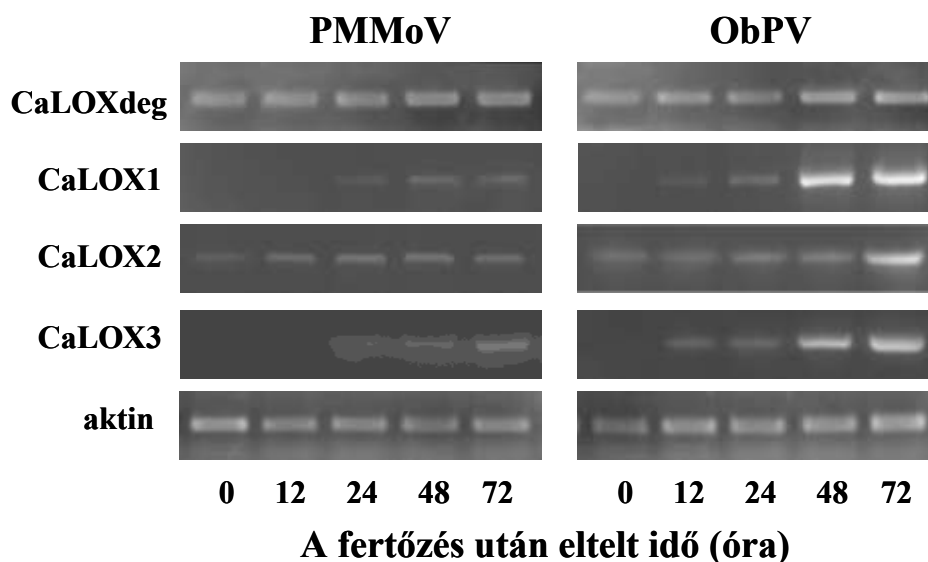


3. ábra. A 9- és 3-lipoxigenázok által termelt zsírsav-hidroperoxidok elválasztása HPLC technikával. Vizsgált zsírsav-hidroperoxidok és redukált származékaik: 13-hidroperoxi-linolénsav (13-HPOT), 13-hidroxi-linolénsav (13-HOT), 9-hidroperoxi-linolénsav (9-HPOT), 9-hidroxi-linolénsav (9-HOT).

4. A lipoxigenáz enzimeket kódoló gének expressziójának a változásai vírusfertőzött paprika levelekben

A fenti eredmények alapján feltételezhető volt hogy az ObPV fertőzés jelentősen megnöveli a LOX fehérjét kódoló gének expresszióját is paprika levelekben. A kérdés megválaszolásához reverz-transzkripció (RT)-PCR vizsgálatokat végeztünk. Az ObPV-sal és PMMoV-sal fertőzött, valamint a kontroll levelekből a teljes RNS izolálása után végeztük el a reverz transzkripciót, majd PCR reakciókat. A fertőzés hatására aktiválódó paprika LOX gének megtalálásához először degenerált PCR primereket terveztünk, ismert burgonya,

dohány és paradicsom LOX szekvenciák felhasználásával. A PCR reakciók termékeit agaróz gélen végzett gélelektroforézissel detektáltuk. A degenerált primerpárral végzett vizsgálatok kimutattak egy, az ObPV fertőzés hatására gyengén indukálódó, de konstitutívan is jelenlévő, feltételezhetően LOX-ot kódoló génterméket (4. ábra). A PCR terméket kompetens *E. coli* baktériumban klónoztuk, majd megszekvenáltattuk. A látszólag egységes PCR termék szekvenálása meglepő módon két új, részleges LOX szekvenciát eredményezett, amelyeket a GenBank adatbázisban is elhelyeztünk (azonosítószámuk: **DQ473539** and **DQ473540**). A szekvenciák bioinformatikai elemzésével több, a lipoxigenázokra jellemző szekvenciamotívumot sikerült kimutatni. Paprikában jelenleg csak egy LOX génnek ismert a teljes kódoló szekvenciája, amit 2009-ben publikált egy dél-koreai kutatócsoport, és amit *CaLOX1*-nek nevezték el (GenBank azonosító száma: **FJ377808**). Ezért az általunk talált 2 új LOX gént *CaLOX2* és *CaLOX3*-nak neveztük el. A *CaLOX1*, *CaLOX2* és *CaLOX3* szekvenciákra specifikus primer párokat terveztünk, majd ezekkel a primerpárokkal is elvégeztük az RT-PCR reakciókat. A PCR reakciók minden esetben a várt génterméket eredményezték, amit szekvenálással is igazoltunk minden esetben. Az ObPV fertőzés minden esetben az egyedi LOX gének expressziójának a növekedését idézte elő (4. ábra). A *CaLOX1* és *CaLOX3* gének



4. ábra. Paprika lipoxigenáz izoenzimeket kódoló gének aktiválódása Óbuda paprika vírussal (ObPV) és paprika enyhe tarkulás vírussal (PMMoV) fertőzött TL 1791 paprika fajta leveleiben. Két független biológiai kísérlet reprezentatív eredményei szerepelnek az ábrán.

transzkriptumai már 12 órával a fertőzés után akkumulálódtak a paprika levelekben és a mennyiségük folyamatosan emelkedett. A két gén aktiválódása megelőzte a nekrotikus tünetek megjelenését ill. a LOX aktivitás emelkedését. A *CaLOX2* gén csak 72 órával a fertőzés után aktiválódott. A PMMoV fertőzés csak kismértékben fokozta a három *LOX* gén expresszióját. A fertőzések során gyenge mechanikus sérülés is éri a levél felületét. Vírusok jelenléte nélkül végzett ál-fertőzések is indukálták a három *LOX* gén expresszióját, és ez a hatás nem volt szignifikánsan kisebb, mint a PMMoV fertőzés hatása, ami arra utal hogy a vírusok hatása ebben az esetben elhanyagolható. A fenti eredmények azt mutatták, hogy az ObPV fertőzés mindhárom *LOX* gén expresszióját lényegesen megnövelte. A paprika genomában lévő *LOX* gének száma nem ismert. Az egyetlen eddig ismert teljes szekvencia (*CaLOX1*) mellett azonban a GenBank és a Gene Index Project adatbázisokban számos olyan töredék nukleotid szekvencia (expressed sequence tag, EST) ismert, amely jellegzetes LOX motívumokat tartalmaz. Ezeknek a jelenleg ismert szekvenciáknak a számítógépes összeillesztése majd szekvencia-összehasonlítása azt mutatta, hogy legkevesebb 12 *LOX* gén található a paprikában (nem közölt eredmény). A szintén a *Solanaceae* családba tartozó burgonyában 14 teljes *LOX* gént szekvenáltak meg eddig.

A génexpressziós vizsgálatok során a konstitutíven kifejeződő aktin gén expresszióját mértük kontrollként. A PCR vizsgálatok során kapott feltételezhetően aktint kódoló génterméket megszekvenálva valóban egy új, részleges aktin szekvenciát nyertünk, amit a GenBankban is elhelyeztünk (azonosítószáma: **DQ832719**).

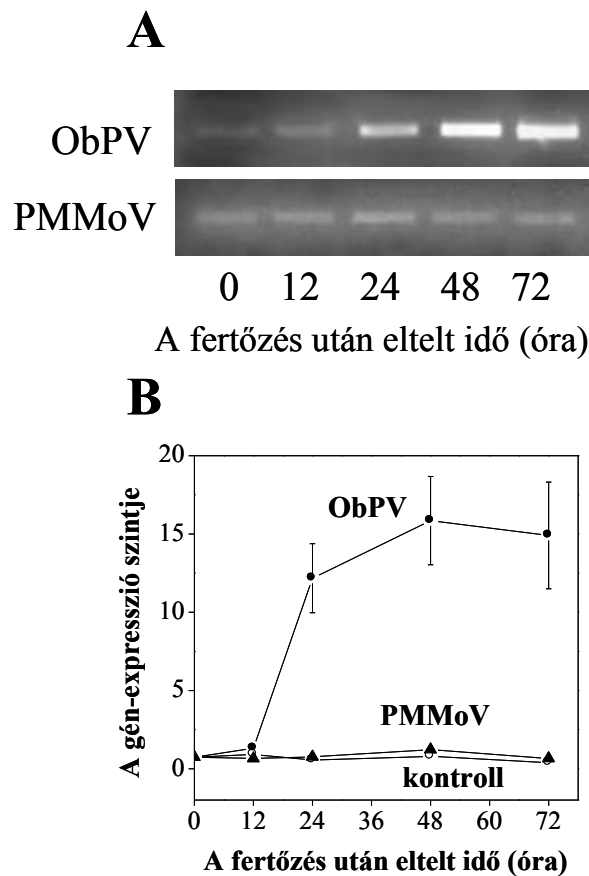
A jövőben valamennyi paprika LOX enzimet kódoló gént meg kell ismernünk ahhoz, hogy átfogó képet nyerjünk a vírusfertőzések hatásáról a zsírsavak peroxidációjára paprika levelekben. Feltételezhető, hogy a lipoxigenázok által termelt toxikus lipid-hidroperoxidok részt vesznek a nekrotikus léziók megjelenésében. A LOX enzimeknek szerepük lehet a sejtmembránoknak a fertőzés következtében lezajló átstrukturálódásában, az ehhez szükséges katabolikus folyamatokban. A zsírsav-hidroperoxidok további enzimatis reakciók során zajló átalakulásai a különböző biológiailag aktív oxilipinek akkumulációjához vezetnek.

5. Az oxilipinek bioszintézisében meghatározó enzimeket kódoló gének expressziójának a változásai vírusfertőzött paprika levelekben

A zsírsav-hidroperoxidok legalább hét ismert enzimatis úton alakulnak tovább. A reakció-sorok első, meghatározó enzimeinek a kódoló génjei csak 3 esetben ismertek növényekben: az allénoxid-szintetáz (AOS), a hidroperoxid-liáz (HPL) és a divinil-éter szintetáz (DES) enzim

esetében. RT-PCR technikával megvizsgáltuk az AOS, HPL és DES gének expresszióját ObPV-sal és PMMoV-sal fertőzött, valamint a kontroll paprika levelekben. A vizsgálatainkat megelőzően nem irtak még le AOS és DES génszekvenciákat paprikában, csak egy HPL szekvencia volt ismert. Ezért az *AOS* és *DES* gének esetében degenerált primerpárokat terveztünk ismert burgonya, dohány és paradicsom szekvenciák felhasználásával, míg a *HPL* gén esetében egy paprika gén-specifikus primer párt használtunk. A PCR reakciók termékeit agaróz gélen végzett gélelektroforézissel detektáltuk. A degenerált primerpárral végzett vizsgálatok során sikerült megszekvenálni egy-egy új, részleges *CaAOS* és *CaDES* szekvenciát, amelyeket a GenBank adatbázisban is elhelyeztünk (azonosítószámuk: **DQ832720** and **DQ832721**). A *CaAOS* és *CaDES* szekvenciák nagy szekvencia hasonlóságot mutattak az adatbázisokban található ortológ génekkel és jellegzetes szekvencia-motivumokat tartalmaztak. A *CaAOS* és *CaHPL* gének expressziója nem változott szignifikánsan sem az ObPV-sal sem a PMMoV-sal fertőzött paprika levelekben a kontrollhoz képest. Ezzel szemben az ObPV hatására a *CaDES* gén transzkriptuma igen nagy mennyiségben akkumulálódott (5A. ábra). Hasonlóan a *LOX* gének esetében tapasztaltakhoz, a *CaDES* gén expressziója csak igen kis mértékben indukálódott a PMMoV fertőzés hatására (5A. ábra). A *CaDES* gén aktiválódás mértékének pontos megismeréséhez kvantitatív, valós-idejű RT-qPCR vizsgálatokat is végeztünk. Az eredmények szerint az ObPV fertőzés következtében nagyon jelentősen, 18-szorosra nőtt a *CaDES* transzkriptum mennyisége 48 órával a fertőzést követően, míg a PMMoV fertőzésnél csak 1,6-szoros emelkedést tapasztaltunk (5B. ábra).

A fenti vizsgálatok igazolták, hogy az oxilipin reakcióutak közül a ObPV-sal fertőzött paprika levelekben a divinil-éterek szintéziséhez vezető reakcióút fokozottan aktiválódik. Fontossága miatt a *CaDES* gén teljes kódoló szekvenciáját szerettük volna megismerni, amely célunkat több egymást követő PCR reakció segítségével, részben a 3'-RACE technikával, részben degenerált primerpárokkal végzett PCR reakciókkal, a gén darabok megszekvenáltatása és számítógépes összeillesztése után sikeresen elértünk. A teljes *CaDES* gént kódoló nukleotid szekvenciát a GenBank adatbázisban is elhelyeztük (azonosítószáma: **DQ832721**). A nukleotid szekvenciából átírható *CaDES* fehérje 478 aminosavból áll, elméleti móltömege 54035. A *CaDES* fehérje nagy (90-91%) homológiát mutatott burgonya, dohány és paradicsom 9-*CaDES* fehérjékkel, de 13-*DES* fehérjékkel szemben a homológia mértéke csak sokkal kisebb, 39%-os volt. A nagyon magas szekvencia-homológia miatt az általunk megszekvenált 9-*CaDES* gén feltehetően a homológ génekhez hasonló módon működik paprika levelekben. A világhálón keresztül működtethető ChloroP 1.1 and TargetP 1.1



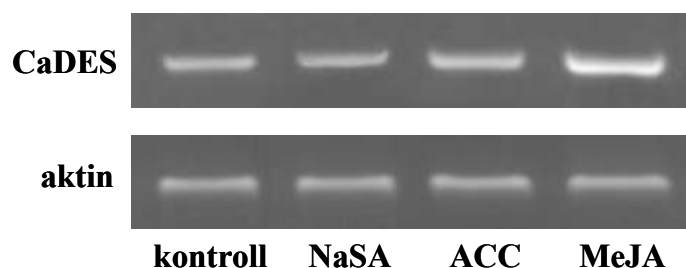
5. ábra. A paprika divinil-éter szintetáz (*CaDES*) gén aktiválódása Óbuda paprika vírussal (ObPV) és paprika enyhe tarkulás vírussal (PMMoV) fertőzött TL 1791 paprika fajta leveleiben, tradicionális RT-PCR módszerrel (A) és valós idejű RT-qPCR technikával (B) vizsgálva. Három független biológiai kísérlet reprezentatív eredményei szerepelnek az ábrán.

bioinformatikai programok szerint a fehérjelánc nem tartalmaz tranzit-peptideket, tehát a fehérje feltehetően a citoszólban helyezkedik el.

A mi eredményeinkhez hasonlóan a *DES* gén erőteljes aktiválódását és az *AOS* és *HPL* gének változatlan expresszióját találták *Phytophthora infestans*-al fertőzött paradicsom levelekben is. Számos tanulmány igazolta a DES enzimek által termelt divinil-éterek fokozott felhalmozódását fertőzött növényi szövetekben és kimutatták direkt antimikrobiális hatásukat baktériumokkal és gombákkal szemben. A divinil-éterek szerepe a vírusokkal fertőzött növényekben viszont teljesen ismeretlen, így további vizsgálatok szükségesek ennek felderítéséhez.

6. Növényi hormonok hatása a divinil-éter szintetáz gén kifejeződésére paprika levelekben

Ismeretes, hogy különböző növényi hormonok jelentősen felszaporodnak mikrobiális fertőzések hatására, ami jelentősen megváltoztathatja a növények génexpressziós mintázatát. Ezáltal lényegesen befolyásolják a növények védekezési folyamatait, többek között az indukált rezisztencia kialakulását. Ezért megvizsgáltuk három növényi hormon, a nátrium-szalicilát (NaSA), az etilén-prekurzor 1-aminociklopropán-1-karboxilsav (ACC), és a metil-jazmonát (MeJA) hatását a *CaDES* gén expressziójára. A kísérleteket paprika levélkorongokkal végeztük, amelyeket Petri csészékben, a hormonok 0,1 mM-os vizes oldatain úsztatva inkubáltunk 24 órán keresztül. A levélszövetekből a teljes RNS tartalom kivonása után specifikus primerekkel RT-PCR reakciókat végeztünk.



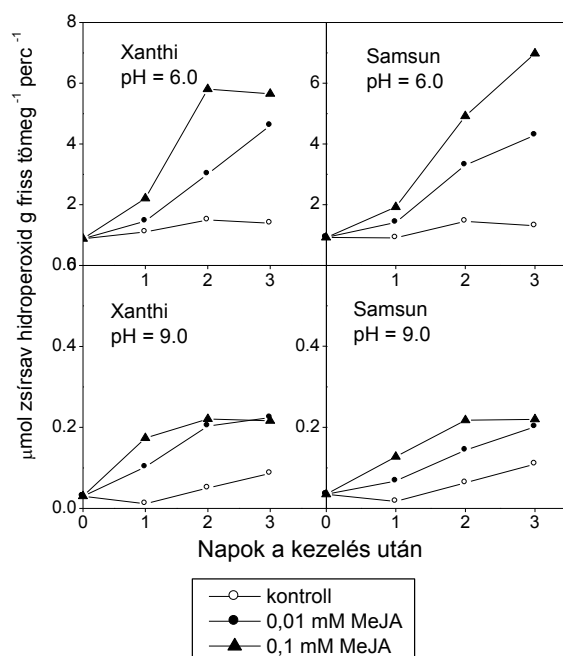
6. ábra. A paprika divinil-éter szintetáz (*CaDES*) gén aktiválódása növényi hormonokkal történő kezelések hatására. Paprika levélkorongokat 0,1 mM nátrim-szalicilát (NaSA), 0,1 mM 1-aminociklopropán-1-karboxilsav (ACC) és 0,1 mM metil-jazmonát (MeJA) oldatokkal kezeltünk 24 órán keresztül majd RT-PCR vizsgálatokat végeztünk. A konstitutíven kifejeződő aktin gén expresszióját mértük kontrollként. Két független biológiai kísérlet reprezentatív eredményei szerepelnek az ábrán.

A NaSA és ACC kezelések a fenti kezelési körülmények között nem befolyásolták szignifikánsan a *CaDES* gén expresszióját. Ezzel szemben a 0,1 mM MeJA oldatokkal történő kezelés hatására a *CaDES* transzkriptum mennyisége jelentősen felszaporodott a paprika levélkorongokban a kontroll kezelésekhez képest (6. ábra). Ez a kísérlet rámutatott arra, hogy a jázmonsav fontos szerepet játszik a *CaDES* gén szabályozásában.

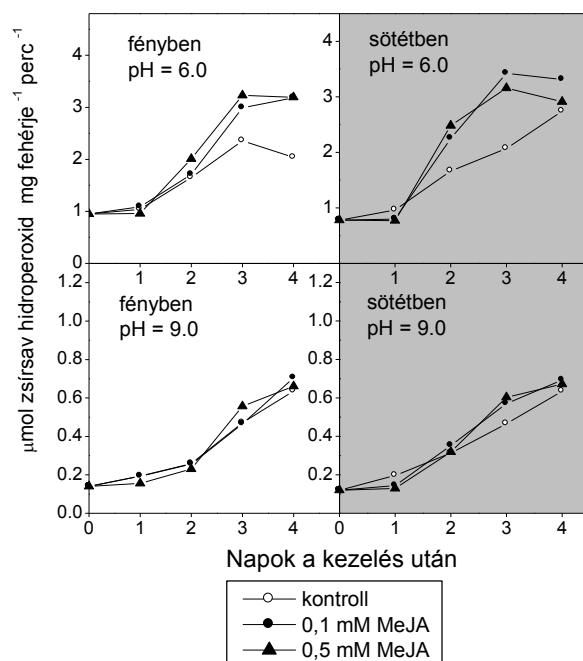
7. Metil-jazmonát kezelés hatása dohány és paprika levélszövetek lipoxigenáz aktivitására

A növényi hormonok közül a metil-jazmonát (MeJA) szerepét igazoltuk a *CaDES* gén indukciójában. További ismereteket kívántunk szerezni a MeJA hatásairól, ezért megvizsgáltuk a MeJA oldatokkal történő kezelések hatását a dohány és paprika levelek LOX aktivitására. A kísérleteket Xanthi-nc és Samsun dohány valamint TL 1791 paprika levélkorongokkal végeztük, amelyeket Petri csészékben, a MeJA különböző koncentrációjú vizes oldataiban úsztatva inkubáltunk 72 ill. 96 órán keresztül. A levélszövetekben spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg a LOX aktivitásokat, pH 6,0 és 9,0 értékeknél.

Dohány levélkorongokban a MeJA kezelések nagymértékben indukálták a LOX aktivitásokat mind a TMV fertőzéssel szemben rezisztens Xanthi-nc, mind a fogékony Samsun fajták esetében (7. ábra). Az enzimaktivitás méréseket két különböző pH értéken végeztük, mivel ezeken a pH értékeken különböző izoenzimek aktiválódnak. Feltehető egyes korábbi közlemények alapján, hogy az alacsonyabb pH 6,0 értéknél a 9-LOX indukció, míg pH 9,0 értéknél a 13-LOX indukció a meghatározó, bár az izoenzimek nagy száma és különböző viselkedésük miatt ez dohányban még nem bizonyított. Mindkét pH értéknél jelentős LOX indukciót tapasztaltunk a MeJA kezelések hatására, bár a pH 9,0 értéknél mért aktivitások lényegesen kisebbek voltak mint pH 6,0-nál (7. ábra).



7. ábra. Metil-jazmonát (MeJA) hatása a teljes lipoxigenáz (LOX) aktivitásra Xanthi-nc és Samsun dohánylevélkorongokban két különböző pH értéken meghatározva.



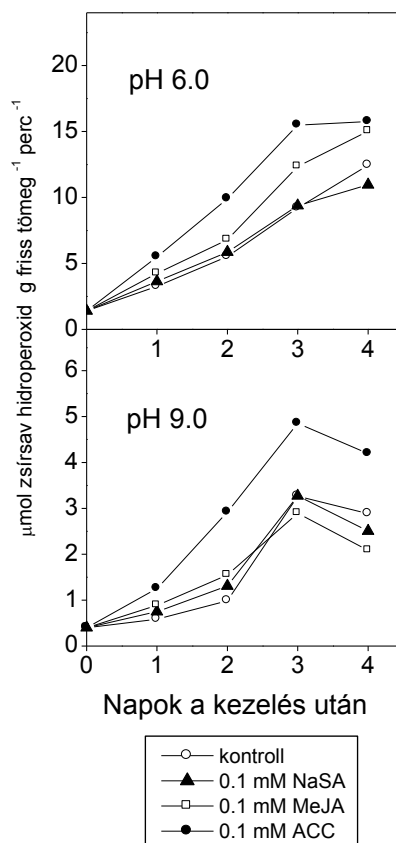
8. ábra. Metil-jazmonát (MeJA) hatása a teljes lipoxigenáz (LOX) aktivitásra TL 1791 paprika fajta levélkorongjaiban fényben és sötétben két különböző pH értéken meghatározva.

A két dohány fajtától eltérően, a paprika levélkorongok LOX aktivitását csak igen kis mértékben befolyásolta a MeJA kezelés, annak ellenére hogy magasabb MeJA koncentrációkat alkalmaztunk ebben az esetben. A paprika levélkorongokat sötétben és állandó megvilágítás mellett ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ PAR) is inkubáltuk, hogy átfogóbb képet nyerjünk a hormon esetleges hatásairól. A MeJA kezelések pH 6,0 értéknél csak 3 nappal a kezelés megkezdése után indukálták csekély mértékben a LOX aktivitást a megvilágított korongokban. A sötétben inkubált korongok esetében 1 nappal korábban jelentkezett az indukáló hatás. A MeJA kezelések nem gyakoroltak semmilyen hatást a LOX aktivitásokra a pH 9,0 értéknél az állandó megvilágítás mellett inkubált levélkorongokban, míg a sötétben inkubált levélkorongok esetében egy igen gyenge LOX indukció volt észlelhető (8. ábra).

8. Növényi hormonok hatása a lipoxigenáz enzim aktivitására paprika levelekben

Megvizsgáltuk három különböző növényi hormon, a nátrium-szalicilát (NaSA), az etilén-prekurzor 1-aminociklopropán-1-karboxilsav (ACC), és a metil-jazmonát (MeJA) hatását a LOX enzimaktivitásra TL 1791 paprika fajta levélszöveiben. A kísérleteket paprika

levélkorongokkal végeztük, amelyeket Petri csészékben, a hormonok 0,1 mM-os vizes oldatain úszatva inkubáltunk 24 órán keresztül. A levélkorongokat állandó megvilágítás mellett ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ PAR) inkubáltuk. A levélszövetekben spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg a LOX aktivitásokat, pH 6,0 és 9,0 értékeknél.

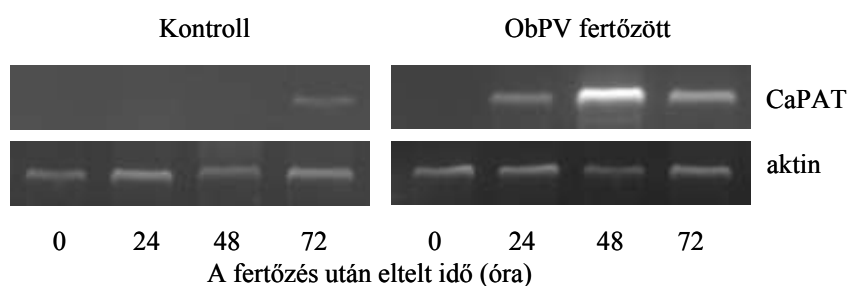


9. ábra. Lipoxigenáz (LOX) aktivitás indukciója növényi hormonokkal paprika levélszövetekben. Kezelések: 0,1 mM nátrim-szalicilát (NaSA), 0,1 mM 1-aminociklopropán-1-karboxilsav (ACC) és 0,1 mM metil-jazmonát (MeJA) vizes oldatokkal.

A három kezelést összehasonlítva a legnagyobb LOX indukáló hatást az etilén prekursor ACC fejtette ki, amely mindkét vizsgált pH érték esetében jelentősen megnövelte az enzimaktivitásokat, már 2 nappal a kezelések megkezdése után. Az előző kísérletekben kapott eredményekkel összhangban a MeJA kezelés pH 6,0-nál kismértékben megnövelte a LOX aktivitást, de pH 9,0-nél nem mutatott hatást. A nátrium-szalicilát kezelések nem gyakoroltak hatást a LOX aktivitásra egyik pH értéken sem (9. ábra).

9. Egy patatin típusú lipid acil hidroláz (lipáz) enzim kódoló génjének expressziója vírussal fertőzött paprika levelekben

A fertőzés következtében a sejtmembránok szerkezete átalakul, lipid peroxidáció következik be és különböző jelátviteli anyagok szabadulnak fel. Ezekben a folyamatokban különböző lipázok is szerepet játszanak, többek között a membrán lipidekből szabad telítetlen zsírsavakat hasítanak le, amelyek a LOX enzimek szubsztrátumai. Így egyes lipázok és a LOX-ok által katalizált folyamatok szorosan összefüggenek. A patatin-szerű lipid acil-hidroláz típusú lipázok a galakto- és foszfolipidekből is képesek szabad telítetlen szénláncú zsírsavakat lehasítani. Megvizsgáltuk egy ilyen lipáz enzimet kódoló gén (*CaPAT1*) expresszióját ObPV-sal fertőzött, rezisztens TL 1791 paprika fajta leveleiben. A Gene Index Project adatbázisból kiválasztott TC12193 jelű szekvenciára specifikus primert terveztünk, majd RT-PCR módszerrel követtük a gén-expresszió változásait. A fertőzés hatására a *CaPAT1* gén expressziója igen jelentősen megemelkedett a fertőzés során, az aktiválódás maximális értéke 2 nappal a fertőzés után volt megfigyelhető (10. ábra), ami egybeesik a *CaLOX* gének jelentősebb mértékű aktiválódásával, de megelőzi a nektótikus betegségtünetek megjelenését.

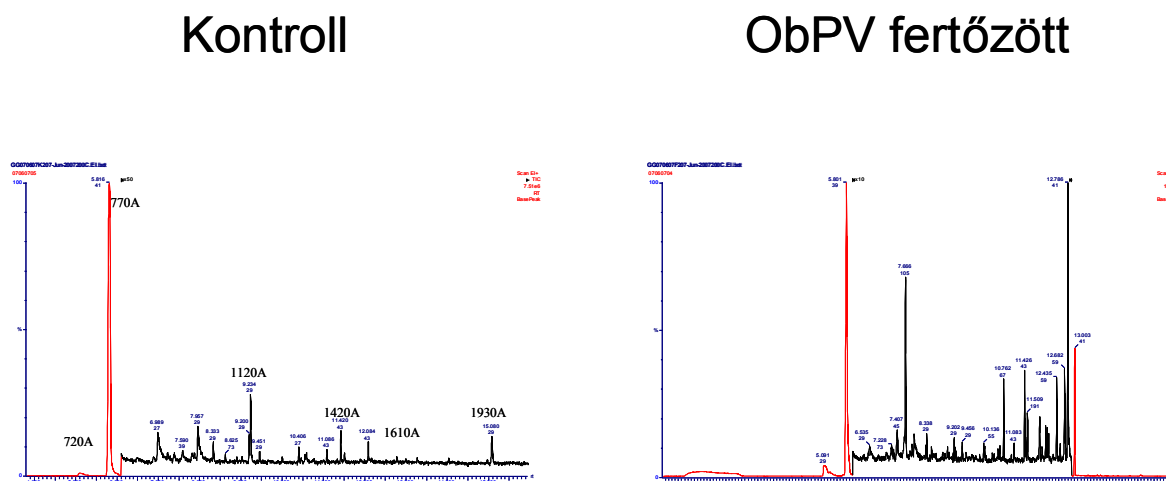


10. ábra. Egy patatin-szerű lipázt kódoló gén (*CaPAT*) aktiválódása Óbuda paprika vírussal (ObPV) fertőzött és kontroll TL 1791 paprika fajta leveleiben. A konstitutíven kifejeződő aktin gén expresszióját mértük kontrollként. Két független biológiai kísérlet reprezentatív eredményei szerepelnek az ábrán.

10. A vírusfertőzés hatása az illékony oxilipin vegyületek bioszintézisére paprika levelekben

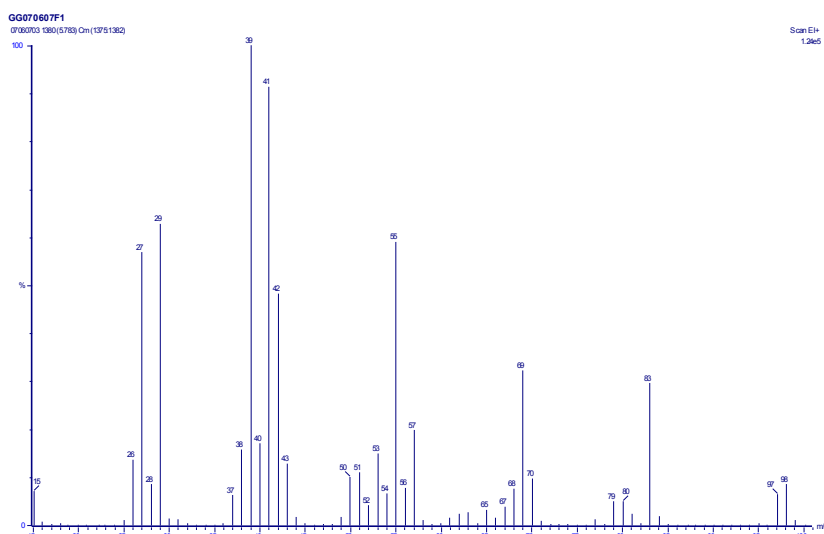
Az oxilipin bioszintetikus útvonalak egyik legfontosabbika a hidroperoxid-liáz (HPL) enzim által katalizált reakció, amely során a LOX enzimek által termelt a zsírsav-hidroperoxidok hasadásával illékony, rövid szénláncú vegyületek keletkeznek. Az illékony oxilipinek sok esetben biológiailag aktívak (hírvivő molekulák ill. antimikrobiális hatásuk van).

Az ELTE TTK Kémiai Intézetével együttműködve megvizsgáltuk az illékony, kismolekulatömegű anyagok felszaporodását ObPV-sal fertőzött ill. kontroll, rezisztens TL 1791 paprika fajta leveleiben. A vizsgálatokat gázkromatográfiás elválasztás után végzett tömegspektrometriai elemzéssel (GC-MS) végeztük el. Kezdetben jelentős megoldandó probléma volt a mintavételi és mintakezelési módszer kidolgozása (extrakció). Több módszer kipróbálása után a legmegfelelőbb a levelek folyékony nitrogénnel történő eldörzsölését követő, zárt térben történő szilárd fázisú adszorbensen történő megkötés bizonyult (SPME-mintavevő szál használatával). A gázkromatográfiás elválasztás optimalizálása után számos illékony komponens sikerült kimutatni a kontroll és ObPV-fertőzött paprika levelekben (11. ábra).



11. ábra. Illékony, kis molekulatömegű vegyületek kimutatása Óbuda paprika vírussal (ObPV) fertőzött és kontroll TL 1791 paprika fajta leveleiben gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel. Az ábrán a kontroll és fertőzött minták össziónáram-grafikonjai láthatóak.

A GC-MS módszer segítségével a tömegspektrumok alapján számos illékony komponens sikerült azonosítani. A fontosabbak ezek közül: hexanal, 2-transz-hexenal, 2,4-hexadienal, metil-szalicilát, 1-etenil-1-metil-2,4-bisz(1-metiletenil)-ciklohexán, pentadekanal és alfa-jonon. A jellemző tömegspektrumok közül a 2-transz-hexenalét mutatjuk be a 12. ábrán. Egyértelműen megállapítható volt, hogy a vírusfertőzött ill. a nem fertőzött paprika levélminták illékonyanyag-kibocsátása különböző, a fertőzés lényegesen megnövelte számos illékony vegyület kibocsátását. Így a nagy illékonyságú 2,4-hexadienal, az alfa-jonon és a pentadekanal mennyisége jelentősen megemelkedett a vírusfertőzés következtében. Az alfa-jonon nem a lipid hidroxidok hanem a karotenoidok bomlásterméke. Egyes komponensek (pl. 2-transz-hexenal és a metil-szalicilát) mennyiségét viszont a fertőzés nem befolyásolta szignifikánsan. A fertőzött levelekben több olyan, egyelőre azonosítatlan anyagot is észleltünk, amelyek a fertőzetlen levelekben nem voltak detektálhatóak. Nem volt különbség a fertőzetlen kontroll növények levelei és a fertőzött növény nem fertőzött levelei között az illékony anyagok kibocsátását összehasonlítva.



12. ábra. A 2-transz-hexenal jellemző tömegspektruma. Az Óbuda paprika vírussal (ObPV) fertőzött TL 1791 paprika fajta levelkivonatának gázkromatográfiás elválasztása után nyert frakció tömegspektrometriás elemzésével határoztuk meg a töredékionok eloszlását.

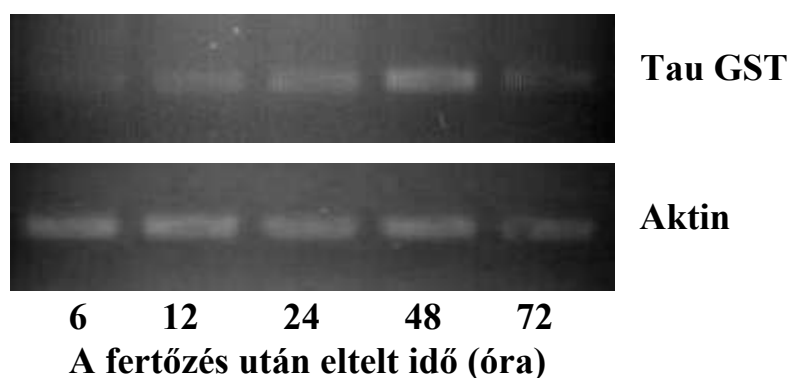
Összehasonlítottuk a fenti inkompatibilis növény-kórokozó kapcsolatot egy kompatibilis kapcsolattal (paprika enyhe tarkulás vírussal fertőzött TL 1791 paprikafajta). Az illékony

vegyületek képződése jelentősen eltért a kétféle növény-vírus kapcsolat között, elsősorban a képződött illékony anyagok mennyiségi viszonyait tekintve, a kompatibilis kapcsolatban kisebb mértékű volt az illékony anyagok felhalmozódása.

11. A glutation S-transzferáz gének szerepének vizsgálata vírusfertőzött Xanthi-nc dohánylevelekben

Az oxilipinek metabolizmusában a fenti enzimeken kívül fontos szerepet játszanak a glutation S-transzferáz (GST, E. C. 2.5.1.18) izoenzimek is. Az egyes GST izoenzimek által katalizált redukciós reakció során a toxikus zsírsav-hidroperoxidokból a jóval kevésbé mérgező zsírsav-hidroxiidok keletkeznek. A reakció során a ko-szubsztrátum redukált glutationból a glutation oxidált, diszulfid formája keletkezik. Olyan méregtelenítési, antioxidáns reakció ez, amely megakadályozza a zsírsav-hidroperoxidok túlzott felhalmozódását.

A GST enzimek szerepének vizsgálatához megvizsgáltuk a Tau osztályú GST gének expressziójának változásait TMV-sal fertőzött, rezisztens Xanthi-nc dohánylevelekben, RT-PCR technikával. A számos stresszben fontos szerepet játszó Tau osztályú GST enzimekre specifikus primerpárt használtunk a vizsgálatokhoz. A PCR reakciók egy amplifikációs terméket adtak, amelynek szekvenálása igazolta a Tau GST gén azonosságát. A kezeltlen Xanthi-nc növények leveleiben a GST enzimet kódoló gén expressziója gyenge volt, de TMV fertőzés hatására a gén transzkripciója nagymértékben indukálódott, a legerősebb indukciót 48 órával a fertőzést követően mutattunk ki (13. ábra).



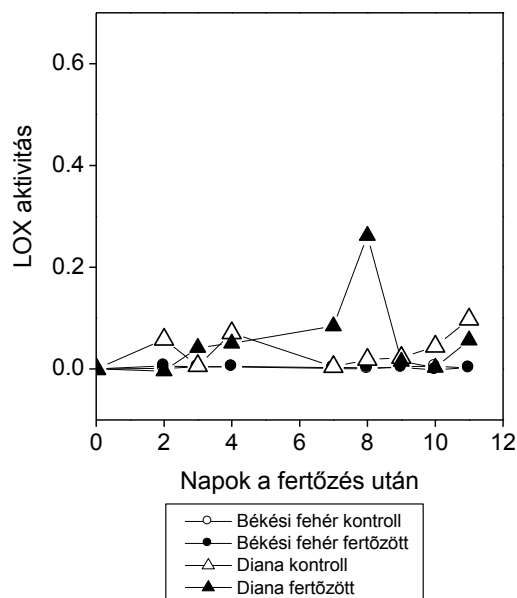
13. ábra. TMV fertőzés hatásának vizsgálata egy Tau osztályú glutation S-transzferáz (NtGST) enzimet kódoló gén expressziójára Xanthi-nc dohánylevelekben RT-PCR módszerrel. Az konstitutíven kifejeződő aktin gén expresszióját kontrollként vizsgáltuk.

A kontroll levelekben a gén-expresszió szintje nem változott 72 óra során. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megállapítsuk az enzim pontos szerepét a vírusokkal szembeni védekezési reakciókban. A GST feltehetően a vírus-indukált nekrotikus léziók kiterjedésének a korlátozásában játszik szerepet a rezisztens növényekben.

Az általunk megszekvenált *NtGST* szekvenciával nagy fokú homológiát mutatott számos, a GenBank adatbázisban található Tau osztályú *GST* génnel. Az *NtGST* génnel egy 99 %-os azonosságot mutató szekvenciát találtunk viszont a Gene Index Project bioinformatikai adatbázisában (tentative consensus sequence TC6532). Ez a szekvencia tartalmazza a *NtGST* gén teljes fehérje kódoló szakaszát.

12. A lipoxigenáz (LOX) enzim szerepének vizsgálata *Uromyces phaseoli* gombával fertőzött babnövényekben

A vizsgálatok kezdeti szakaszában kiválasztottunk két olyan babfajtát, amelyek az *Uromyces phaseoli* biotróf rozsdagombával történő mesterséges fertőzéssel szemben különböző toleranciát mutattak: az erősen fogékony Békési fehér ill. a mérsékelten fogékony Diana



14. ábra. Az *Uromyces phaseoli* rozsdagombával történő fertőzés hatása bablevelek lipoxigenáz aktivitására a mérsékelten fogékony Diana, valamint az erősen fogékony Békési fehér fajtákban.

fajtát. A babnövényeket *Uromyces phaseoli* gombával mesterségesen fertőztük, majd spektrofotometrikus módszerrel mértük a LOX aktivitásokat. A tünetek (szemmel látható rozsdatelepek a levél felületén) mintegy 6-8 nappal a fertőzést követően jelentek meg a fogékony leveleken. A LOX enzim aktivitása kismértékben emelkedett a mérsékelten fogékony Diana fajta leveleiben, de nem változott az erősen fogékony Békési fehér fajta leveleiben (14. ábra).

Konklúziók

A lipoxigenáz (LOX) enzimek és az általuk termelt lipid-hidroperoxidokból enzimatikus úton képződő, változatos szerkezetű oxilipinek jelentős szerepet játszanak a vírusfertőzött dohány és paprikanövények védekezési reakcióiban. A vírusfertőzött növényi levelekben mind a 9- mind a 13-LOX enzimek aktivitása megemelkedik. Az inkompatibilis gazdanövény-kórokozó kapcsolatokban (a rezisztens növényekben) az aktivitás emelkedése gyorsabban és nagyobb mértékben zajlik le, mint kompatibilis kapcsolatokban. Tömegspektrometriás mérésekkel kimutatható volt, hogy az oxilipinek mellett terpenoid jellegű vegyületek is felhalmozódnak a vírusfertőzött levelekben. Kimutattuk a divinil-éter szintetáz (DES) gén és egy patatin-szerű lipáz gén szerepét a vírusfertőzött paprikalevelek védekezési reakcióiban.